

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

07.09.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 9月 7日

REC'D 27 OCT 2000

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第252851号

WIPO

PCT

出願人  
Applicant(s):

明治製菓株式会社

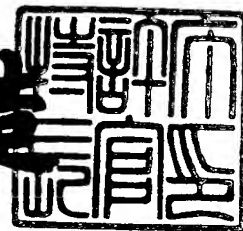
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3083125

【書類名】 特許願

【整理番号】 PM1536

【提出日】 平成11年 9月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品  
技術研究所内

    【氏名】 渡辺 学

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県小田原市栢山 7 8 8 明治製菓株式会社 薬品  
技術研究所内

    【氏名】 村上 健

【特許出願人】

    【識別番号】 000006091

    【氏名又は名称】 明治製菓株式会社

    【代表者】 北里 一郎

    【電話番号】 03-3273-3357

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 008305

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 要約書 1

    【物件名】 図面 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 PF1022物質生産菌で機能する制御DNA配列

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 PF1022物質生産菌で機能するプロモーター又はその改変体。

【請求項 2】 PF1022物質生産菌で機能するターミネーター又はその改変体。

【請求項 3】 配列番号 1 に示す塩基配列を有するプロモーター又はその改変体。

【請求項 4】 配列番号 2 に示す塩基配列を有するターミネーター又はその改変体

。

【請求項 5】 請求項 1 又は請求項 3 に記載のプロモーター又はその改変体を含む発現ベクター。

【請求項 6】 請求項 2 又は請求項 4 に記載のターミネーター又はその改変体を含む発現ベクター。

【請求項 7】 発現ベクター-pABPd。

【請求項 8】 発現ベクターが外来遺伝子を含有することを特徴とする請求項 5 ～請求項 7 のいずれか一項に記載の発現ベクター。

【請求項 9】 請求項 5 ～請求項 8 のいずれか一項に記載の発現ベクターを用いて形質転換された微生物。

【請求項 1 0】 微生物がPF1022物質生産菌である請求項 9 に記載の微生物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は無孢子不完全菌に属するPF1022物質生産菌で機能するプロモーター及びターミネーター、それらを含む発現ベクター、及びそれにより形質転換された糸状菌に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

糸状菌であるPF1022株 (Mycelia sterilia) は駆虫活性を有する新規な24員環状デプシペプチドであるPF1022物質を生産する(本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に微工研条寄第2671号(FERM BP-2671)として寄託されている)

。本菌株は有性及び無性の生殖器官を形成しないため、無孢子不完全菌に分類される（特開平3-35796号）。

#### 【0003】

一方、薬剤耐性ととともにアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) 由来のタカアミラーゼ遺伝子を連結したプラスミドをPF1022物質生産菌に導入し、形質転換体を得ることに成功したことから、PF1022物質生産菌においても遺伝子組換えの応用が可能であることが示された（W097/00944号）。

#### 【0004】

しかしながら、上記特許公報に示されているアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) 由来のタカアミラーゼ遺伝子の制御DNA配列（プロモーター及びターミネーター）は、異種菌株由来の制御DNA配列であるため、PF1022物質生産菌が持つ遺伝子の発現と同調して、その発現制御がなされるかどうかの問題は解決されていない。特にPF1022物質生産菌において、PF1022物質生産に関わる遺伝子を発現制御させる場合は、宿主細胞が持つPF1022物質生産関連遺伝子群の発現に協調して目的遺伝子を発現制御させる事が必要である。

#### 【0005】

さらに、PF1022物質生産菌は無孢子不完全菌に属するため、アスペルギルス (Aspergillus) 属、トリコデルマ (Trichoderma) 属、フザリウム (Fusarium) 属又はノイロスポーラ (Neurospora) 属等において活用されている従来の制御DNA配列が合目的に発現するかどうかの問題も解決されていない。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

PF1022物質生産菌に内在する遺伝子であり、かつPF1022物質生産時に発現する制御DNA配列（プロモーター及びターミネーター）、PF1022物質生産菌を宿主として利用する事ができる発現ベクター、この発現ベクターに組込まれた遺伝子を発現するPF1022物質生産菌を提供する。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため、PF1022物質生産菌において、高率に

発現している遺伝子として、Abp1遺伝子の制御DNA配列（プロモーター及びターミネーター）を単離、同定した。

【0008】

また、本発明のAbp1遺伝子の制御DNA配列（プロモーター及びターミネーター）を用いた遺伝子発現用の発現ベクターを作製し、PF1022物質生産菌に導入し、得られた形質転換体で、該プロモーターの下流に連結した遺伝子の機能を損なうことなく効率的に発現させ、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち本発明は、

- (1) PF1022物質生産菌で機能するプロモーター又はその改変体、
  - (2) PF1022物質生産菌で機能するターミネーター又はその改変体、
  - (3) 配列番号 1 に示す塩基配列を有するプロモーター又はその改変体、
  - (4) 配列番号 2 に示す塩基配列を有するターミネーター又はその改変体、
  - (5) (1) 又は (3) に記載のプロモーター又はその改変体を含む発現ベクター、
  - (6) (2) 又は (4) に記載のターミネーター又はその改変体を含む発現ベクター、
  - (7) 発現ベクター-pABPd、
  - (8) 発現ベクターが外来遺伝子を含有することを特徴とする (5) ～ (7) のいずれか一つに記載の発現ベクター、
  - (9) (5) ～ (8) のいずれか一つに記載の発現ベクターを用いて形質転換された微生物、
  - (10) 微生物がPF1022物質生産菌である (9) に記載の微生物、
- に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

PF1022物質生産菌のmRNAをPF1022物質生産時の細胞より単離し、それを鋳型に用いてcDNAを合成する。それを無作為に選抜し、塩基配列解析を行い、高い頻度で発現している遺伝子、即ちAbp1遺伝子に由来するcDNAを単離する。

## 【0011】

PF1022物質生産菌からゲノムDNAを抽出し、適当な制限酵素にて切断後、ファージベクター又はプラスミドベクターを用いて、PF1022物質生産菌のゲノムDNAからなるライブラリーを作製する。

## 【0012】

このように調製したPF1022物質生産菌由来のゲノムDNAライブラリーより、Abp1遺伝子をコードする翻訳領域をプローブとして用いて、Abp1遺伝子全長のクローニングを行う。単離されたゲノムDNA及び前記cDNAの塩基配列を比較検討し、本遺伝子のプロモーター及びターミネーター部位を決定し、この制御DNA配列を用いて発現ベクターの構築を行う。

## 【0013】

本発明による「発現ベクター」とは、配列番号1及び／又は配列番号2に記載されるDNA配列を含んだ組換えベクターを意味する。本発明による組換えベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

## 【0014】

遺伝子工学の慣行法（例えば部位指定変異等）を用いて本発明の組換えベクターの制御DNA配列（プロモーター及びターミネーター）に関して、付加、挿入、欠失又は置換等の改変を行ったDNA断片（改変体）も本発明に包含される。また、プロモーター及びターミネーターの塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合わせた形で（取り出して）使用する場合も本発明に包含される。

## 【0015】

また、本発明のプロモーター及びターミネーターは上述のようにして決定された塩基配列に対してストリンジントな条件、例えば0.5×SSC濃度、60℃15分間の洗浄条件においてもハイブリダイズし、かつプロモーター及び／又はターミネーターの制御機能を有する塩基配列をも包含する。

## 【0016】

ここで用いる「組換えベクター」とは、宿主染色体DNAに組込まれるもの、或いは自己複製可能な自律的複製配列を有するベクターを宿主細胞内で、プラスミ

ド状態で存在させるものであり、例えばpUC系（pUC18又はpUC118等）、pBluescript系（pBluescriptII KS+等）又はpBR322等のプラスミドが挙げられる。尚、宿主細胞内に存在する遺伝子のコピー数は、1コピーでも複数であっても良い。

【0017】

本発明による組換えベクターは、これを実際に宿主微生物内に導入して所望のタンパク質を発現させるために、常法に従い、目的タンパク質をコードする外来遺伝子の翻訳領域を組換えベクターの該プロモーターの下流に順方向に挿入するか、又は他種タンパク質の翻訳領域をコードする外来遺伝子と連結させて融合タンパク質として発現させる事もできる。ここでいう「外来遺伝子」とは、発現の対象となる任意の遺伝子を意味し、異種遺伝子又は同種遺伝子のどちらでも良い。特にこれらに限定されるものではないが、例えばPF1022物質生産関連遺伝子群から選ばれる遺伝子等が挙げられる。

【0018】

さらに、上記の方法で単離したAbp1遺伝子のプロモーター及びターミネーターは、例えばPCR法により適当な制限酵素切断部位を導入し、プラスミドベクターに挿入した後、薬剤耐性及び／又は栄養要求性相補等の選択マーカー遺伝子を連結して遺伝子発現用の組換えベクターを作製することができる。例えば薬剤耐性としてデストマイシン、ベノミル、オリゴマイシン、ハイグロマイシン、G418、ブレオマイシン、ピアラフォス、ブラストサイジンS等、或いはamdS、pyrG、argB、trpC又はniaD等の様な栄養要求性等の遺伝子マーカーを含んでもよい。

【0019】

このようにして得られた組換えベクターにより、宿主を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、所望のタンパク質を著量生産させることができる。

【0020】

使用される宿主としては、遺伝子組換えの宿主として使用可能な微生物であれば特に限定されるものではないが、糸状菌、好ましくはPF1022物質生産菌、特に好ましくはPF1022株（FERM BP-2671）である。

【0021】

宿主への遺伝子発現用の組換えベクターの導入は、常法に従ってすることができ、例えばエレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法、リチウム法又は塩化カルシウム法等が用いられ、宿主細胞にとって効率の良い手法が選択される。PF1022物質生産菌を宿主として用いる場合、特に限定されるものではないが、好ましくはポリエチレングリコール法である。

#### 【0022】

また、形質転換体の培養も常法に従って、培地、培養条件等を適宜選択することにより行うことができる。培地としては、慣用の成分、例えば炭素源としては、グルコース、シュークロース、セルロース、水飴、デキストリン、澱粉、グリセロール、糖蜜、動・植物油等が使用できる。また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、コーン・ステープ・リカー、綿実粕、ブイヨン、ペプトン、イーストエキス、硫酸アンモニウム、硝酸カリウム、尿素等が使用できる。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸及びその他のイオンを生成することのできる無機塩類、例えば塩化カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸一カリウム、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸銅等を添加することも有効である。また、必要に応じて各種ビタミン、アミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素、抗生物質等の選抜薬剤を添加することもできる。さらに、菌の発育を助け、導入遺伝子の発現を促進するような有機物及び無機物を適当に添加することができる。

#### 【0023】

培養方法は、これらの成分を選択的に含む培地で行うことができ、液体培地では、好氣的条件での培養法、振とう培養法、通気攪拌培養法又は深部培養法により行うことができる。培地のpHは、例えばpH 6～pH 8程度である。培養温度は通常の条件、例えば温度14℃～40℃、好ましくは26℃～37℃、培養日数は、2日～25日間程度の条件で行うことができる。

#### 【0024】

また、本発明による実施の態様としては、形質転換された細胞の培養物から、目的とする遺伝子発現産物であるタンパク質を取得することができる。培養物から抽出（磨砕処理、加圧破碎等）、回収（ろ過、遠心分離等）及び精製（塩析法



、溶媒沈殿法等)の手法を用いることができる。

【0025】

また、これらの過程において、必要に応じてフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)、ベンズアミジン又はロイペプチン等のプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。

【0026】

【実施例】

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0027】

#### 実施例 1 cDNAのランダムシーケンスによる高発現遺伝子の検索

PF1022物質生産菌内で高率に発現している遺伝子を検索するため、PF1022物質生産菌由来のcDNAを無作為にクローニングし、そのDNA配列の比較を行い、大量に発現している遺伝子を分離同定した。

【0028】

#### (1) PF1022物質生産菌由来cDNAの調整

PF1022物質生産菌 (FERM BP-2671) をW097/00944号の実施例4に記載されている生産培地で26℃、4日間培養し、遠心分離 (3000rpm、10分) により菌体を回収した。これを精製水で洗浄し、-80℃で凍結後、液体窒素存在下、ブレンダー (日本精機社製AM-3) で粉碎した。これを変性液 (4Mグアニジンチオシアン酸、25mMクエン酸3ナトリウム、0.5%N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、0.1Mメルカプトエタノール) に懸濁後、室温で5日間攪拌の後、2M酢酸ナトリウム (pH4.5) で中和し、TE飽和フェノールを加え更に攪拌した。ここにクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1) を加え、攪拌の後、遠心分離によりフェノールで変性した菌体成分を分離した。上層 (水層) を回収し、イソプロパノールで核酸を沈殿化した。この沈殿は核酸濃度1mg/μlとなるようにTE (10mMトリス-塩酸 (pH8.0)、1mM EDTA) に溶解し、2.5M塩化リチウムで沈殿化 (5℃、2時間) した。これを遠心分離により回収し、70%エタノールで洗浄後、TEに再溶解し、これを全RNA画分とした。

【0029】

全RNA画分はmRNAピュアリフィケーションキット（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、mRNAを精製した。更に、このmRNAを鋳型にタイムセーバーcDNA合成キット（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、cDNAを合成した。

【0030】

## （2）cDNAのランダムシーケンス

実施例1（1）のように調製したcDNAを、EcoRI切断後、アルカリフォスファターゼ処理したpUC18にDNAライゲーションキットVer.2（宝酒造社製）を用いて連結した。これを大腸菌JM109株に導入し、形質転換した各種コロニーをアンピシリンを含むLB培地（1%ポリペプトン、0.5%イーストエキス、1%塩化ナトリウム）で培養した。これらの形質転換体からのプラスミドの精製はフレキシプレップキット（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いた。

【0031】

上記のように調製した40種のプラスミドをALF DNAシーケンサーII（アマシャムファルマシアバイオテク社製）に供し、挿入断片のDNA配列を解読した。シーケンスゲルはロングレンジャー（FMC社製）、シーケンス反応はオートリードシーケンシングキット（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いた。

【0032】

その結果、10種のクローンが同一のDNA塩基配列を示した。そこでクローン化された遺伝子をAbp1と命名し、本遺伝子のプロモーター及びターミネーターをゲノムDNAよりクローニングすることとした。

【0033】

## （3）PF1022物質生産菌のゲノムDNAの単離

PF1022物質生産菌（FERM BP-2671）のゲノムDNAの単離は（H. Horiuchi et. al., J. Bacteriol., 170, 272-278, (1988)）に記載の方法に従った。具体的には、まずPF1022物質生産菌（FERM BP-2671）をW097/00944号の実施例1に記載されている種培地で2日間培養し、遠心分離（3500rpm、10分）によって菌体を回収した。次いで、得られた菌体を凍結乾燥後、TEに懸濁し、3%SDS溶液中、60℃、3

0分間処理後、TE飽和フェノール抽出により、菌体残渣を除去した。抽出液はエタノール沈殿化後、リボヌクレアーゼA（シグマ社製）及びプロテイナーゼK（和光純薬社製）処理し、さらに12%ポリエチレングリコール6000により核酸を沈殿化させた。これをTE飽和フェノール抽出、エタノール沈殿化を行い、同沈殿をTEに溶解し、これをゲノムDNAとした。

【0034】

#### (4) PF1022物質生産菌のゲノムライブラリーの作製

実施例1（3）のように調製したPF1022物質生産菌由来ゲノムDNAをSau3AIにより部分消化した。これをファージベクター、 $\lambda$ EMBL3クローニングキット（ストラタジーン社製）のBamHIアームにT4リガーゼ（宝酒造社製ライゲーションキットVer.2）を用いて連結させた。これをエタノール沈殿化後、TEに溶解した。連結混合物の全量をギガパックIIIプラスパッケージングキット（ストラタジーン社製）を用いて、大腸菌LE392株に感染させ、ファージプラークを形成させた。この方法により得られた $1.3 \times 10^4$ 個（ $2.6 \times 10^4$ PFU/ml）のファージライブラリーを用いてAbp1遺伝子のクローニングを行った。

【0035】

#### (5) PF1022物質生産菌由来のゲノムDNAからのAbp1遺伝子クローニング

プローブはAbp1遺伝子の翻訳領域をPCR法により増幅し、用いた。実施例1（3）のように調製したゲノムDNAを鋳型に、8-73U及び8-73Rなる合成プライマーを用いて、レッツゴーPCRキット（サワディーテクノロジー社製）に従いPCRを行った。PCRの反応条件は、94℃30秒間、50℃30秒間、72℃90秒間のステップを25回繰り返すことにより増幅を行った。以下に8-73U及び8-73RのDNA配列を示す。

8-73U: CTCAAACCCAGGAAGCTCTTTC（配列番号7）

8-73R: GACATGTGGAAACACATTTTG（配列番号8）

【0036】

このようにして得られたPCR産物はECLダイレクトシステム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、標識化した。実施例1（4）のように作成したファージプラークは、ハイボンドN+ナイロントランスファーマンブラン（アマシャムファルマシアバイオテク社製）に転写し、アルカリ変成後、5倍濃度SSC（

SSC: 15mM クエン酸 3 ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム) で洗浄し、乾燥させ DNA を固定した。キットに記載の方法に従って、1 時間のプレハイブリダイゼーション (42℃) の後、先の標識化したプローブを添加し、16 時間 (42℃) ハイブリダイゼーションを行った。プローブの洗浄は前述キットに記載の方法に従った。プローブの洗浄を行ったナイロン膜は、検出溶液に 1 分間浸したあと、メディカル X 線フィルム (富士写真フィルム社製) に感光させ、1 個の陽性クローンを得た。本クローンはサザン解析の結果、少なくとも 6kb の HindIII 断片がゲノム DNA の制限酵素断片長と一致していた。この HindIII 断片の制限酵素地図を図 1 に示す。HindIII 断片は pUC119 にサブクローニングし (pRQHin/119)、以降の実験に供した。

#### 【 0 0 3 7 】

#### 実施例 2 Abp1 遺伝子のプロモーター及びターミネーターの DNA 配列決定

DNA 配列解析用テンプレートとして pRQHin/119 を SalI 及び SmaI で消化し、同様の制限酵素で消化しておいた pUC18 に連結し、これを DNA 配列解析用テンプレートとした。DNA 配列解析は実施例 1 (2) と同様に行った。次に、実施例 1 (2) で得られた cDNA の塩基配列と比較し、Abp1 遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域を決定し、その DNA 配列をそれぞれ配列表の配列番号 1 及び配列番号 2 に示す。

#### 【 0 0 3 8 】

#### 実施例 3 Abp1 遺伝子の発現制御領域を用いた発現ベクターの構築

pRQHin/119 を鋳型に Abp1 遺伝子のプロモーター領域及びターミネーター領域を PCR 法を用いて増幅した。プロモーターの増幅は ABP-Neco 及び ABP-Nbam、一方、ターミネーターの増幅は ABP-Cbam 及び ABP-Cxba なるプライマーを用い、PCR スーパーミックスハイフィデリティ (ライフテックオリエンタル社製) により PCR 法を行った。反応条件は、94℃ 30 秒間、50℃ 30 秒間、72℃ 90 秒間のステップを 25 回繰り返すことにより増幅を行った。以下に ABP-Neco、ABP-Nbam、ABP-Cbam 及び ABP-Cxba の DNA 配列を示す。

#### 【 0 0 3 9 】

ABP-Neco: GGGGAATTCGTGGGTGGTGATATCATGGC (配列番号 3)

ABP-Nbam: GGGGGATCCTTGATGGGTTTTGGG (配列番号 4)

ABP-Cbam: GGGGGATCCTAAACTCCCATCTATAGC (配列番号 5)

ABP-Cxba: GGGTCTAGACGACTCATTGCAGTGAGTGG (配列番号 6)

#### 【 0 0 4 0 】

各PCR産物はマイクロスピンS-400カラム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）で精製し、エタノール沈殿化の後、プロモーターはEcoRI及びBamHI、ターミネーターはBamHI及びXbaIで消化し、同様の酵素で消化したpBluescriptII KS+に順次連結した。これをXbaIで消化し、pMKD01 (W098/03667号) 由来デストマイシン耐性カセットを挿入しpABPdを構築した（図2）。

#### 【 0 0 4 1 】

実施例 4  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子を用いた発現ベクターの能力確認

レポーター遺伝子として用いた $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の翻訳領域はpLC-GUS (K. Yanai, et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 472-475, (1996)) をBamHIで切断することにより得た。これをあらかじめBamHI消化、アルカリフォスファターゼ処理しておいたpABPdに連結し、Abp1プロモーターの下流にGUS遺伝子が挿入されたプラスミド、pABPd-Gを構築した。

#### 【 0 0 4 2 】

pABPd-GによるPF1022物質生産菌 (FERM BP-2671) の形質転換はW097/00944号の実施例1に記載されている方法に従って行った。その結果、1  $\mu$ gのDNAあたり約3個の形質転換体を得られた。

#### 【 0 0 4 3 】

このようにして得られた形質転換体はW097/00944号の実施例4に記載されている生産培地を用いて液体培養し、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体はミニビードピーター（バイオスベックプロダクツ社製）を用いて細胞を破碎した。これを遠心分離し、菌体残渣を除去し、上澄のGUS活性を測定した。活性測定は (K. Yanai, et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 472-475, (1996)) に記載の方法に従った。

#### 【 0 0 4 4 】

その結果、表 1 から明らかのように、pABPd-G形質転換体のみに顕著なGUS活性

が認められた。すなわち、該発現ベクターであるpABPdは、PF1022物質生産菌で有効に機能することが確認された。

【0045】

【表1】

表 1 形質転換体の GUS 活性		
	発現ベクター	GUS 活性 (A405/ $\mu$ gタンパク質)
形質転換体	pABPd-G	756.9
形質転換体	pABPd-G	832.5
形質転換体	pABPd	0.0
宿主	—	0.0

【0046】

【発明の効果】

本発明である Abp1 遺伝子の制御DNA配列（プロモーター及びターミネーター）を用い作製した発現ベクターは、該プロモーターの下流に連結した遺伝子の機能を損なうことなく効率的にPF1022物質生産菌体内で発現させることが可能である。

【0047】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika kaisha Ltd.

<120> New regulatory DNA sequence that functions in PF1022 producing fungus

<130> PM1536

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1378

<212> DNA

<213> Mycelia sterilia

<400> 1

gtcgacgtgg gtggtgatat catggctgtg gtgtccaaaa ctgtgttagt gactacgaat 60

gaggaaagaa acggttgtgt tgtggcagct gaagactgaa gaaggagcca aagataattc 120

acaatgcgat acggttgcatt caatgcttgt tcaagagagc acgttgcatt taccttgtgt 180

tccctcttc gttgtacaag atcaagtatc ggatgacacc caccocgcaa cggaatcctg 240

gagttcaaag aggggtgtcgt ctacggcatt taggtataga tggcataggg ttgacgtaa 300

gctgaaagct gattacgaga catgagacaa cgaaaataca acggttgtat gcgttcccgt 360

gcttactaaa gtgataacca agagcaacac agccgaaaga aaccgatgct gtctgagggg 420

ttcctttaga gtctacatgg taacgggtgca tgatagaaac atcaaattggc caatcaagtt 480

agtatacctg acgtacatc gctttcttcc ggatcttgcc taaaatatat gtgcctgtcc 540

gaactgtcgg tactgtctcg tactaactgt tcttccgttg aagtcctagg acaagcgccg 600

cgtttgtaga cctacatgat gccacatctt aaagcaggga tctgagacat tttctaaggc 660

atccatatag gcattgggcg ctaagtcggc attgaaggag ataagggggg tgtgaaagtg 720

gtgtgtcaaa aggaggctga ttggctatac cagccgctaa gcaggtgggc tagcagctgt 780

ctgcagctgt gaataacgtc acttgcttag gtatgtccac ctaatgtcag cagatgcaaa 840

tgctgattgg gttaaaatgg gcatgtagtg taggtgccga aaacacgttt agatctagtt 900

aaagggaagc tgaaagctga acctgtcaga aataagcctg ttggaataca acgttgataa 960

cccaattcag tcgtcaaggg tgcctgata tgctggagct tccctgtcgc atttggggt 1020

aactatttca tagtggggca gaatgcaact ctattttcaa ttgaatctaa actattctgg 1080



gtaggagttc tcaatggctc tctcgctgtc acttacacac atcatggggg tcaacaacgt 1140

atacagcttc atagagagtg cggcattgaa gtagctaccg catcgaaccc ggaagcggtt 1200

caagacatgg gcgtacgtag atacatagag tcatagaaac ataaaaggag cttgaagaac 1260

cattcaaac ctaagggctc ctcttctttc tgcatcacat caagaatcat acactcaaac 1320

caggaactct ttctatcttc cctatagcaa ttcccaaac ccatcaatca acctaaca 1378

<210> 2

<211> 1089

<212> DNA

<213> Mycelia sterilia

<400> 2

taaactccca tctatagcgg ttggctgaaa agggagagcg gcaggagaga tcagtctttt 60

gaccagcttg gagatctgat ctgtgtttca gtctcagtaa cttgtgtgga agttacactt 120

ctggctctcc tccttaccag ccttccaggc caaccacaag atgttaggag tttcgctcat 180

ttatatggct ctggcgatga gtagcattta tgaggcatgc acgacatggc tctactgctg 240  
ctctgttggt taggttacct tagctagaca atatcacaat acaaaatgtg gtttccacat 300  
gtcagctggt tctaccgtag tctgagtga atgggtaatt gatataattga gcttgacccc 360  
gcaatattgt aacagagcca acaatgggtc acctggcccc ccagacatgt ggctatataa 420  
gctacctgtc tagcaatcag acttactgat agaacgtccc cctataatgtc ataaaataag 480  
tcactactag aactaccgac agtgtgaaat ccgacagtgt ctggtctgtt gaacatgtca 540  
tgtctatatg aatgaataag aagaagggtg gacgggttag tacgaatctg tatgataatc 600  
aatggtagca gtgatggtaa acagcggatc gggatctagc actgctatgt ctgggtatgt 660  
aatcctggct atgttcataa gggcgacata gaaagaatac ctacagtgtca gcatacgtaa 720  
gctctgtaca tticactgca aatttctgaa caattggaga gcattatgaa atactaaatg 780  
gaactcctca ttataagtgg aaaacagagc gcccttttat tatgaaacag aagcgtcaag 840  
aacgtctttc aacgtcatca gaggcgttcc atccagatca tactttccct tgaaccatgt 900  
tctcgattc agaatcgtag cgatggaaac cgtccagggt tgcctgtcat tcccttgcgt 960  
cccttgcaat aaaatcgtat taccattttc tticgcagcg ccggtcaacg tgagcgacgt 1020

gcccacgttg gagtccacaa tgaccagtgg atcgtcatcc acgccactca ctgcaatgag 1080

tcgcccggg 1089

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 3

ggggaattcg tgggtggtga tatcatggc 29

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 4

gggggatcct tgatgggttt tggg

24

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

gggggatcct aaactcccat ctatagc

27

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

gggtctagac gactcattgc agtgagtgg

29

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

ctcaaaccag gaactctttc

20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

gacatgtgga aaccacattt tg

22

【図面の簡単な説明】

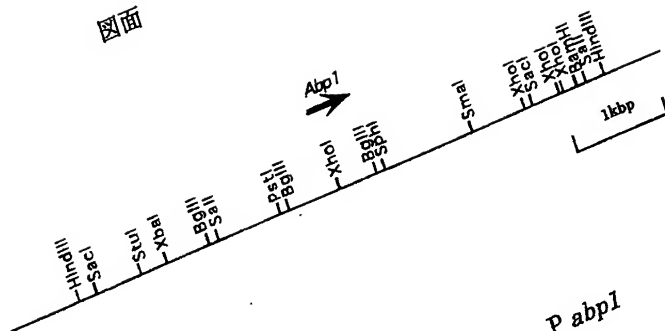
【図 1】

第 1 図に Abp1 遺伝子を含む 6kb の HindIII 断片の制限酵素地図を示す。

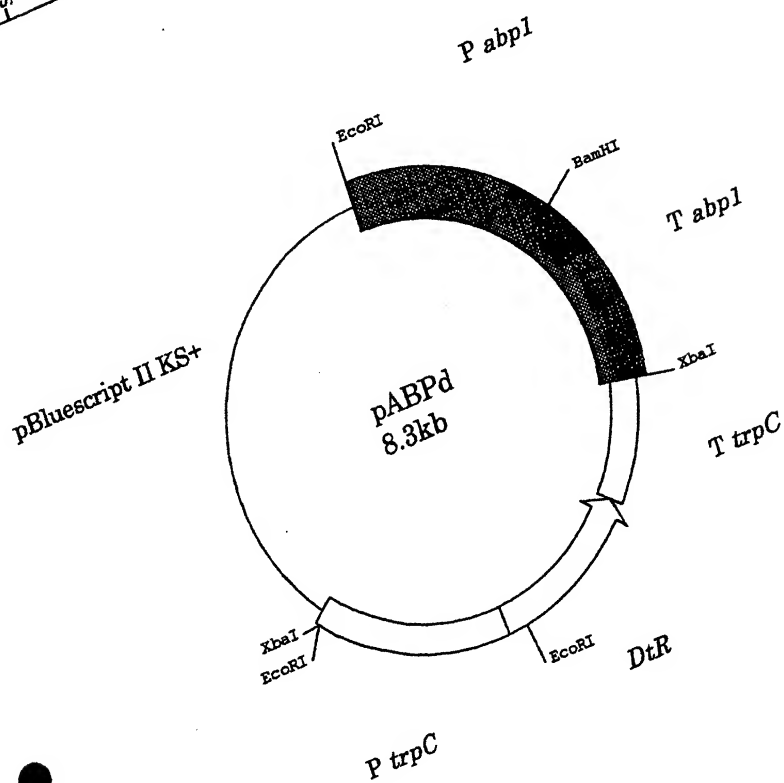
【図 2】

第 2 図に pABPd の構成及び制限酵素地図を示す。

図面



【图2】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 PF1022物質生産菌に内在する遺伝子であり、かつPF1022物質生産時に発現する制御DNA配列（プロモーター及びターミネーター）、PF1022物質生産菌を宿主として利用する事ができる発現ベクターを提供する。

【解決手段】 PF1022物質生産菌において、高率に発現している遺伝子として、Abp1遺伝子の制御DNA配列（プロモーター及びターミネーター）を単離、同定した。これらを用いた遺伝子発現用の発現ベクターを作製し、PF1022物質生産菌に導入し、得られた形質転換体で、該プロモーターの下流に連結した遺伝子の機能を損なうことなく効率的に発現させることを可能とした。

【選択図】 なし。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006091]

1. 変更年月日 1990年 8月 3日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都中央区京橋2丁目4番16号  
氏 名 明治製菓株式会社